

# High mobility group box protein-1 (HMGB-1) vid osteoartrit hos häst

*Tobias Wrangberg*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 34

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Den immunologiska aktiviteten av high mobility group box protein-1 vid osteoartrit hos häst**

High mobility group box protein-1 (HMGB-1) in equine osteoarthritis

*Tobias Wrangberg*

**Handledare:**

Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** Michelle Alexius

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: xx  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** häst osteoartrit inflammation biomarkörer cytokiner HMGB-1

**Key words:** equine osteoarthritis inflammation biomarkers cytokines HMGB-1



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| Sammanfattning .....                 | 1  |
| Summary .....                        | 2  |
| Inledning.....                       | 3  |
| Material OCH metoder.....            | 3  |
| Litteraturoversikt.....              | 3  |
| Ledernas struktur och funktion ..... | 3  |
| HMGB-1 struktur och funktion.....    | 4  |
| Rollen vid inflammation .....        | 5  |
| Rollen vid osteoartrit.....          | 6  |
| Studier på häst .....                | 6  |
| Framtida behandlingsmetoder? .....   | 10 |
| Andra markörer för osteoartrit ..... | 11 |
| Diskussion .....                     | 12 |
| Referenser.....                      | 13 |



## **SAMMANFATTNING**

Osteoartrit (OA) är den vanligaste orsaken till för tidig pension av tävlingshästar och är den sjukdom som står för den enskilt största ekonomiska förlusten inom hästnäringen. Diagnostiken är svår i ett tidigt skede vilket gör att man vill hitta bra markörer och inflammationsmediatorer som kan användas för att snabbt ställa rätt diagnos samt sätta in lämplig behandling. Sedan början av 2000-talet har man i prekliniska studier på gnagare och människor tittat på den pro-inflammatoriska cytokinen high mobility group box protein-1 (HMGB-1) och dess inblandning i inflammationen vid artrit. De senaste åren har det även kommit studier på häst. Det här arbetet går igenom resultatet av dessa studier för att kunna diskutera vilken roll HMGB-1 spelar vid OA, dess lämplighet som markör för sjukdomen och huruvida en inhibering av HMGB-1 skulle kunna användas som en framtida behandlingsmetod. HMGB-1 är ett litet intracellulärt protein som finns i nästan alla celler hos vertebrater, bakterier, växter samt jäst. Det är först de senaste två decennierna som man börjat titta på dess roll som en pro-inflammatorisk cytokin. Proteinet frisätts aktivt från makrofager och monocyter efter aktivering av tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) och interleukin-1 (IL-1). Frisatt HMGB-1 stimulerar makrofagerna till ytterligare frisättning av de pro-inflammatoriska cytokinerna TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 och macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ). HMGB-1 frisätts även passivt från kärnan hos celler som genomgått nekros och indikerar då vävnadsskada (trauma). Studier har visat att HMGB-1 förekommer i ökade koncentrationer i ledvätskan samt synoviala membran hos hästar med OA och att det kan frisättas från synoviocyter. Man har visat att proteinet påverkar uttrycket av gener som är inblandade i bildandet av extracellulärt matrix. Prekliniska försök på möss visar att man kan hindra utvecklingen av OA genom en inhibering av HMGB-1. Arbetets slutsats är att proteinet påverkar inflammationssvaret vid OA hos häst men att det krävs fler och mer omfattande ekvina studier för att kunna använda proteinet som en markör för sjukdomen samt framtida behandlingsmetod.

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is the most common reason for early retirement of competition horses and is the disease that causes the largest economic loss within the equine industry. Since diagnosis is difficult in the initial there is an on-going search for appropriate biomarkers and inflammatory mediators that can be used to diagnose the disease and hence allow commencement of suitable treatment. Preclinical studies on rodents and people, during the past twenty years, have investigated the pro-inflammatory cytokine high mobility group box protein-1 (HMGB-1) and its role in arthritis, which has led to equine studies on the same topic during the last few years. This thesis presents the results of these studies in order to discuss the role of HMGB-1 in equine OA, whether it's suitable as a marker of the disease, and if an inhibition of HMGB-1 could be used successfully to treat OA patients. HMGB-1 is a small protein found in almost all cells in vertebrates, bacteria, plants and yeast, however its role as a pro-inflammatory cytokine has only been studied for the past two decades. The protein is actively secreted from macrophages and monocytes that have been activated by tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 (IL-1). Extracellular HMGB-1 can stimulate an additional secretion of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) from macrophages. HMGB-1 can also be secreted passively from the nucleus of cells that have undergone necrosis. Studies have shown that the concentration of HMGB-1 increases in the synovial fluid and synovial membranes of horses with OA and that it can be secreted from synoviocytes. The protein is also involved in the expression of genes that affect the metabolism of extracellular matrix. Preclinical studies on mice show that the progression of OA can be prevented by an inhibition of HMGB-1. This thesis concludes that the protein affects the inflammatory response in equine OA, however additional studies have to be performed in order to understand if HMGB-1 can be used as a marker for the disease and a future method of treatment.



## INLEDNING

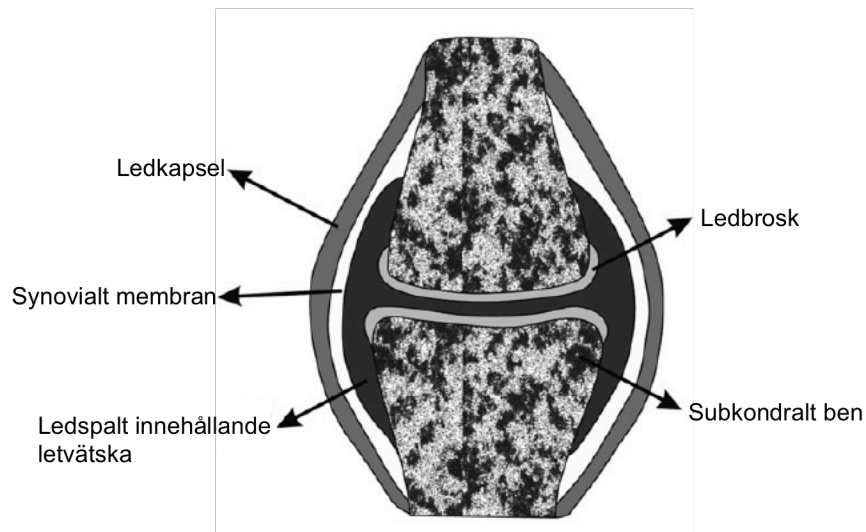
Den huvudsakliga orsaken till hälta och för tidig pension av tävlingshästar idag är ledbesvär (de Grauw, 2011). Osteoartrit (OA) är den sjukdom som står för den enskilt största ekonomiska förlusten inom hästnäringen samtidigt som ledsmärtan är ett djurvälståndproblem. Diagnostiken av OA är svår i ett tidigt skede vilket gör att man vill hitta markörer och inflammationsmediatorer som kan användas för att snabbt ställa rätt diagnos samt sätta in lämplig behandling (van den Boom, 2005). En pro-inflammatorisk cytokin vars inblandning i OA man tittat på de senaste åren är high mobility group box protein-1 (HMGB-1). Inom humanforskningen har man sedan början av 2000-talet gjort prekliniska studier på gnagare och människor (Andersson & Erlandsson-Harris, 2004) och de senaste åren har det även börjat komma studier gjorda på häst. Det här arbetet ska redogöra för vilken roll HMGB-1 spelar vid OA hos häst samt diskutera om en inhibering av HMGB-1 kan användas som en framtida behandlingsmetod av sjukdomen.

## MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har skett i databaserna Google Scholar, CAB abstracts, PubMed, ScienceDirect, Scopus och Web of Science. Olika kombinationer av söktermerna HMGB-1, HMGB, A-box, equine, arthritis, osteoarthritis, synovitis, inflammation, immunology, cytokine, och biomarker har använts.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Ledernas struktur och funktion



Figur 1. Schematisk bild av en synovialled. Källa: de Grauw, J.C. (2011). *Molecular monitoring of equine joint homeostasis. Veterinary Quarterly*, vol. 31(2), ss. 77-86.

En synovialled (Figur 1) består av subkondralt ben, ledbrusk, ledvätska, synovialt membran samt en ledkapsel. Ledbrusket fungerar som stötdämpare och består av chondrocyter, typ II collagen, proteoglykaner, glykoproteiner och vatten. Det saknar både blod samt lymfkärl och får därmed sin näring via diffusion från ledvätskan. Även avlägsnandet av slaggprodukter sker via diffusion till ledvätskan. Ledbrusket är unikt eftersom det helt saknar nervvävnad vilket innebär att en skada på enbart ledbrusket inte orsakar någon smärta vilket försvårar

diagnostiken vid OA (de Grauw, 2011).

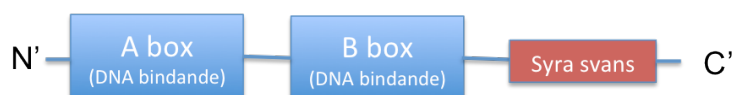
Ledkapseln täcks på insidan av det synoviala membranet som består av synoviocyter (även kallade synoviala fibroblaster) och är 1-3 celler tjockt. Det synoviala membranet är välförsett med nervvävnad och rikligt vaskulariserat. Inflammation är associerat med angiogenes, förtjockning samt fibros av det synoviala membranet och att synoviocyterna producerar cytokiner som frisätts i ledvätskan (de Grauw, 2011).

Eftersom det synoviala membranet endast är några celler tjockt sker det enkelt ett utbyte av molekyler mellan plasman och ledvätskan, man anser därför att ledvätskan är ett ultrafiltrat av plasman. Allt förutom makromolekyler kan passera in i ledvätskan. Frisk ledvätska är klar, viskös och innehåller väldigt få celler. Vid akut ledinflammation ökar cellantalet, företrädesvis på grund av inträde av neutrofiler. Ledvätskan är en viktig länk i kommunikationen mellan det synoviala membranet och chondrocyterna i ledbrösket inte minst vid inflammation. Cytokiner, till exempel  $\text{TNF-}\alpha$  och  $\text{IL-1}\beta$ , samt enzymer, exempelvis matrix-metalloproteinaser som frisätts från synoviocyterna eller infiltrerande leukocyter når chondrocyterna via ledvätskan och påverkar där syntesen samt metabolismen och kan orsaka nedbrytning av ledbrösket (de Grauw, 2011).

Från början fokuserade osteoartrit-forskningen framförallt på ledbrösket men man har insett att lederna måste ses som komplexa organ där samtliga komponenter och vävnader ingår i sjukdomsförloppet (de Grauw, 2011).

### HMGB-1 struktur och funktion

HMGB-1 är ett litet protein bestående av 216 aminosyror (Yang *et al.*, 2005) som upptäcktes på 70-talet (Müller *et al.*, 2004) och har fått sitt namn på grund av sin höga hastighet vid gelelektrofores (Pullerits *et al.*, 2003). Proteinet består av tre domäner, varav två homologa DNA bindande (A-box och B-box) samt en svans med en negativt laddad C-terminal (se Figur 2). HMGB-1 finns i nästan alla celler hos vertebrater, bakterier, växter samt jäst (Yang *et al.*, 2005) och är till 99 % identiskt mellan alla däggdjur (Müller *et al.*, 2004). Det finns i både cellkärnan och cytoplasman i varierande nivåer i olika vävnader (Yang *et al.*, 2005).



Figur 2. Struktur av HMGB-1. Baserad på Yang *et al.*, 2005.

De första studierna på HMGB-1 fokuserade på dess intracellulära roll som ett DNA-bindande protein. HMGB-1 är viktigt för reglering av gentranskription, steroidhormonaktiviteten (Yang *et al.*, 2005) samt nukleosom "sliding" och kromatin omlagring (Ugrinova *et al.*, 2009). Nukleosom sliding är en process där nukleosomerna glider på DNA för att göra nukleosomalt DNA tillgängligt (Mueller-Planitz *et al.*, 2013). Försök med HMGB-1 defekta möss har visat att mössen dör kort efter födseln, troligtvis på grund av utebliven aktivering av glukokortikoidreceptorgener (Yang *et al.*, 2005).

### ***Rollen vid inflammation***

HMGB-1s intracellulära roll har varit känd länge men under de senaste femton åren har man börjat titta mer på dess extracellulära roll och upptäckt proteinets funktion som en cytokin. De proinflammatoriska egenskaperna sitter i B-box medan A-box har en antagonistisk anti-inflammatorisk effekt som kan användas i terapeutiskt syfte (Kokkola *et al.*, 2003). A-box antagonistiska effekter sitter i att den kompetitivt binder till receptorer på aktiverade makrofager och därmed dämpar B-box proinflammatoriska effekt (Yang *et al.*, 2004). Inom humanmedicinen har höga nivåer av HMGB-1 upptäckts i ledvätskan hos patienter med reumatoid artrit. De proinflammatoriska mediatorerna tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) och interleukin-1 (IL-1) inducerar frisättning av HMGB-1 från monocyter och makrofager (Pullerits *et al.*, 2003) genom lysosomal exocytos (Kokkola *et al.*, 2003). HMGB-1 finns i cellkärnan hos makrofager och vid aktivering av dessa omdistribueras proteinet från cellkärnan till organeller i cytoplasman för att sedan frisättas (Andersson & Erlandsson-Harris, 2004). Frisatt HMGB-1 kan stimulera makrofagerna till ytterligare frisättning av proinflammatoriska cytokiner, exempelvis TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 och macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) (Pullerits *et al.*, 2003). HMGB-1 signaleringen sker troligtvis huvudsakligen genom *the receptor for advanced glycation end products* (RAGE) (Kokkola *et al.*, 2003). RAGE tillhör immunoglobulin superfamiljen och uttrycks på flertalet olika celler till exempel neuron, glatt muskulatur, mononukleära fagocyter och endotelceller. När HMGB-1 binder in till cellytan uppregleras transkriptionen av RAGE (Andersson & Erlandsson-Harris, 2004). I försök med makrofager från råttor har man visat att när HMGB-1 binder till receptorn leder det till fosforylering av MAP kinaser samt translokering av NF- $\kappa$ B (Kokkola *et al.*, 2005). Detta leder till den proinflammatoriska effekten eftersom NF- $\kappa$ B är en viktig transkriptionsfaktor som är delaktig i produktionen av flertalet cytokiner och adhesionsmolekyler (Pullerits *et al.*, 2003). HMGB-1 kan även binda till toll-like receptor 2 (TLR-2) och IL-1 receptor I men det är oklart om det påverkar cellens proinflammatoriska signalering (Kokkola *et al.*, 2005).

Studier har visat att HMGB-1 frisättning kan vara ett resultat av vävnadshypoxi vilket är vanligt förekommande vid artrit och synovit. I ledvätskeprov har man påvisat en tydlig korrelation mellan koncentrationen av HMGB-1 och mjölksyra som är en markör av vävnadshypoxi (Hamada *et al.*, 2008). Vävnadshypoxin leder till nekros vilket ger en passiv frisättning av HMGB-1 från upplösta cellkärnor hos de nekrotiska cellerna. HMGB-1 kan därmed vara en viktig länk till den inflammation som uppkommer till följd av oprogrammerad celldöd. Även en aktivering av komplementsystemet har visats leda till ökade extracellulära koncentrationer av HMGB-1 (Kokkola *et al.*, 2003).

### **Rollen vid osteoartrit**

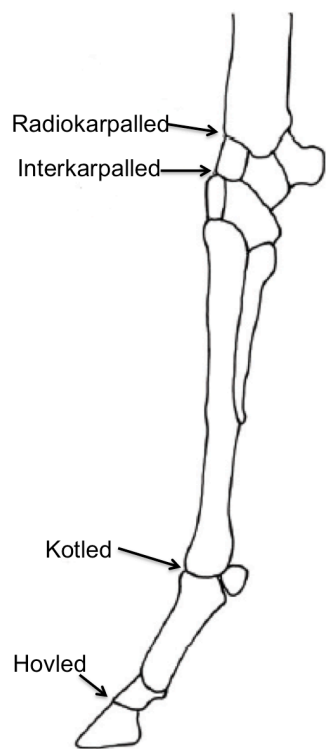
I en studie har man injicerat möss med 1µg eller 5µg HMGB-1 intraartikulärt (Pullerits *et al.*, 2003). Leder dissekerades efter 4, 7 samt 28 dagar för histopatologisk och immunohistokemisk undersökning. Man fann att artrit hade utvecklats i 80% av djuren och vid undersökning av vilka celltyper som fanns i ledvätskan hittade man mestadels Mac-1+ makrofager och endast ett fåtal CD4+ lymfocyter. Pannus (granulationsvävnad) utvecklades hos några av mössen 7 dagar efter injektionen. För att utvärdera betydelsen av olika sorters vita blodkroppar avlägsnade man, in vivo, olika sorters blodkroppar från vissa av mössen med hjälp av läkemedlet etoposid och monoklonala antikroppar. Etoposid har visat sig kunna selektivt avlägsna monocyter samt neutrofiler hos möss och de monoklonala antikropparna användes för depletion av neutrofiler. Man såg ingen skillnad på artritens utveckling bland möss där monocyter, granulocyter eller T/B lymfocyter avlägsnats men bland möss där man avlägsnat både neutrofiler och monocyter såg man en 43 % lägre incidens av artrit. Hos IL-1-receptor-defekta möss utvecklades ingen inflammation vid HMGB-1 injektion. HMGB-1 inducerar IL-1-produktion genom aktivering av NF-κB men saknas IL-1-receptorerna så kan IL-1 inte utöva sin proinflammatoriska effekt. Studien drog slutsatsen att HMGB-1 inte enbart är en markör för ledinflammation utan dessutom är delaktig i utvecklingen av inflammationen genom aktivering av makrofager samt inducering av IL-1-produktion genom NF-κB aktivering. IL-1 har påvisats leda till brosk och bendestruktion (Pullerits *et al.*, 2003). HMGB-1s effekt verkar vara begränsad till makrofager och monocyter eftersom man vid in vitro studier inte har lyckats aktivera lymfocyters cytokinproduktion (Andersson *et al.*, 2000). Sammantaget tycks alltså det ospecifika immunförsvaret spela huvudrollen vid HMGB-1 inducerad artrit.

I en studie där man tittat på brosk i knäna hos apor och människor har man konstaterat att chondrocyter uttrycker RAGE och att fler receptorer uttrycks vid OA. HMGB-1 kan därmed binda in till RAGE på chondrocyter och stimulera MAP kinaser samt NF-κB aktivitet. Man såg även en ökad produktion av matrix-metalloproteinase 13 (MMP-13) som bidrar till brosknedbrytning (Loeser *et al.*, 2005).

### **Studier på häst**

Det finns tre studier på häst där man mätt nivåer av HMGB-1 i ledvätska (De Grauw *et al.*, 2010) (Brown *et al.*, 2009) (Dagis Boström, 2013), en som tittat på hur HMGB-1 påverkar uttrycket av gener som styr broskmetabolism (Ley *et al.*, 2011), och en som tittar på HMGB-1 produktion i synoviala membran (Ley *et al.*, 2007).

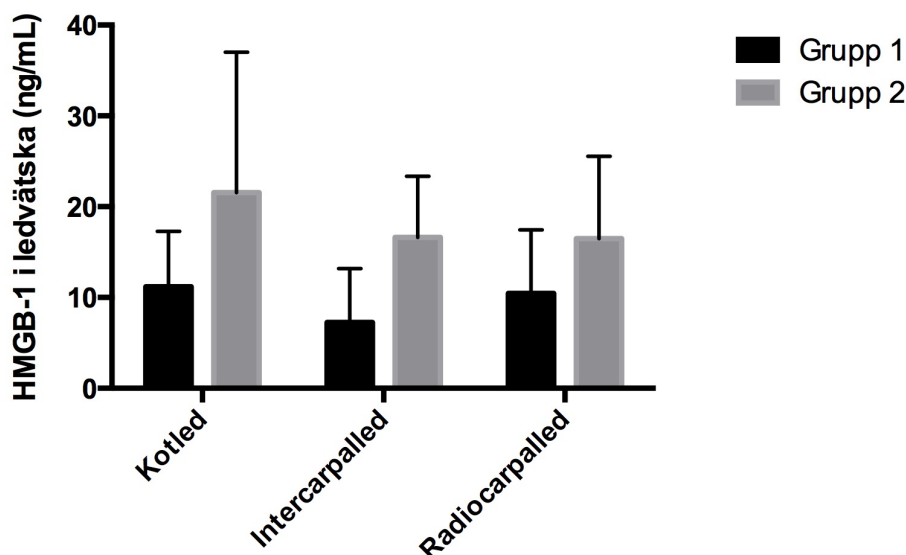
Den mest omfattande studien som gjorts på häst är Brown *et al.*, 2009, där man använt sig av totalt 85 fullblodshästar. Hästarna var uppdelade i två grupper där grupp 1 bestod av 40 två-åringar som efter klinisk undersökning och röntgen konstaterats ha friska leder. Grupp 2 bestod av 45 hästar i åldern 2-6 år som genomgått artroskopi för borttagning av osteochondrala fragment som uppkommit i samband med tävlingsskador. Man tog ledvätskeprov från samtliga hästar. I grupp 1 provtogs 20 hästar i metakarpofalangealleden (kotled fram), 10 i intercarpalleden, 10 i radiocarpalleden och i grupp 2 togs ledvätskeproven



Figur 3. Illustration av hästens radiokarpalled, interkarpalled, kotled och hovled Källa: Ley C. (2010) *Inflammatory Response in Equine Joints Diss.* Uppsala Sveriges Lantbruksuniversitet (Ritat av Karolina Larsson).

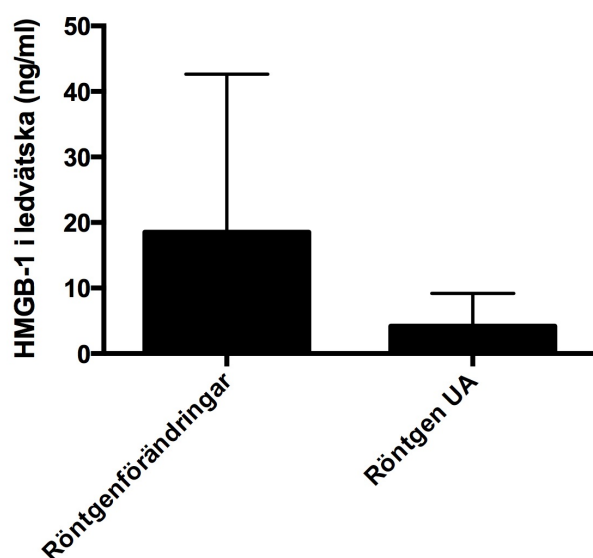
före artroskopin i metakarpofalangealleden hos 14 av hästarna, interkarpalleden hos 17, radiokarpalleden hos 10 samt metatarsofalangealleden (kotled bak) hos 4 (se Figur 3). Ledvätskeproven analyserades med ELISA. Medelvärdena för nivåerna av HMGB-1 i ledvätskan finns sammanställda i Figur 4. Metatarsofalangealleden finns inte med då denna bara undersöktes i grupp 2 (Brown *et al.*, 2009).

Figur 4 visar signifikant högre nivåer av HMGB-1 i ledvätskan hos hästarna med osteochondrala fragment (Grupp 2) vilket innebär att de osteochondrala skadorna har lett till en frisättning av HMGB-1 till den extracellulära vätskan (Brown *et al.*, 2009). Makrofager och monocyter i det synoviala membranet kan utsöndra HMGB-1 efter att ha aktiverats av  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  och IL-1 (Yang *et al.*, 2005).  $\text{TNF-}\alpha$  och IL-1 har tidigare visats spela en stor roll i osteoartrit (Brown *et al.*, 2009). Studier har visat att HMGB-1 finns i chondrocyter och synoviocyter hos människor (Kokkola *et al.*, 2002). Resultaten från Brown *et al* tyder på att det samma gäller för hästar och att HMGB-1 frisatts från dessa celler till ledvätskan. Den exakta mekanismen bakom detta är oklar (Brown *et al.*, 2009).



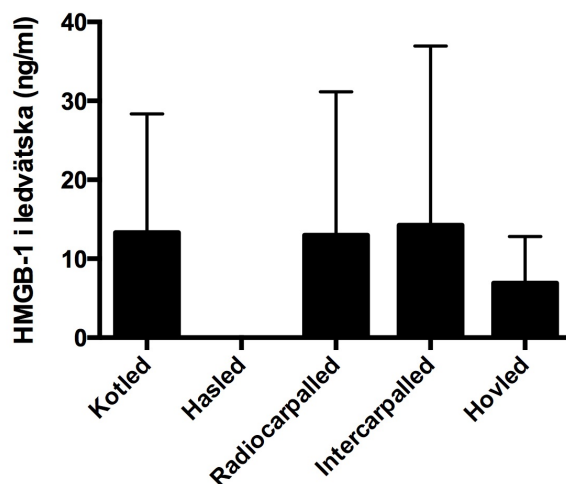
Figur 4. Medelvärde (med standardavvikelse) för nivåerna av HMGB-1 i ledvätskan (ng/mL) i kotled, interkarpalled och radiokarpalled i respektive grupp. Baserad på data från Brown *et al*, 2009.

I *Dagis Boströms* studie (2013) togs också ledvätskeprov från olika leder för analys av HMGB-1 men man använde sig av betydligt färre hästar (14 stycken) och enda gemensamma nämnaren var att de uppvisade en initialhätta vid klinisk undersökning på Universitetsdjursjukhuset Ultuna. På grund av urvalsgruppens ringa storlek går det inte att dra några signifikanta slutsatser men man kan däremot se vissa trender. Vissa av hästarna röntgades vid sitt besök och tar man medelvärde för HMGB-1 i ledvätskan (ng/mL) i leder med röntgenförändringar jämfört med leder utan röntgenförändringar ser man ett högre medelvärde i gruppen med röntgenförändringar (*Figur 5*).



*Figur 5. Medelvärde (med standardavvikelse) av HMGB-1 i ledvätskan i leder med röntgenförändringar och leder som var utan anmärkning på röntgen. Data från Dagis Boström, 2013.*

Gör man en sammanställning som *Brown et al* (2009) där man jämför nivåerna av HMGB-1 i olika leder (*Figur 6*) kan man konstatera att man inte har uppmätt HMGB-1 i hasleder. Endast fyra hasleder ingick i studien så det går inte att dra några slutsatser. Däremot påvisades lindriga osteofyter (benpålagringar) i den ena hasleden och detta var den enda leden i studien där denna röntgenförändring inte sammanföll med mätbara nivåer av HMGB-1 (Dagis Boström, 2013). Tyvärr ingick inga hasleder i *Brown et al*s studie (2009) vilket innebär att det inte finns något att jämföra med. Det går däremot att konstatera att även i studien av *Brown et al* kunde man se skillnader på HMGB-1 nivåer i ledvätskan i olika leder trots att de varit utsatta för samma skada. Detta väcker frågan om huruvida normalnivåerna av HMGB-1 skiljer sig mellan olika leder.

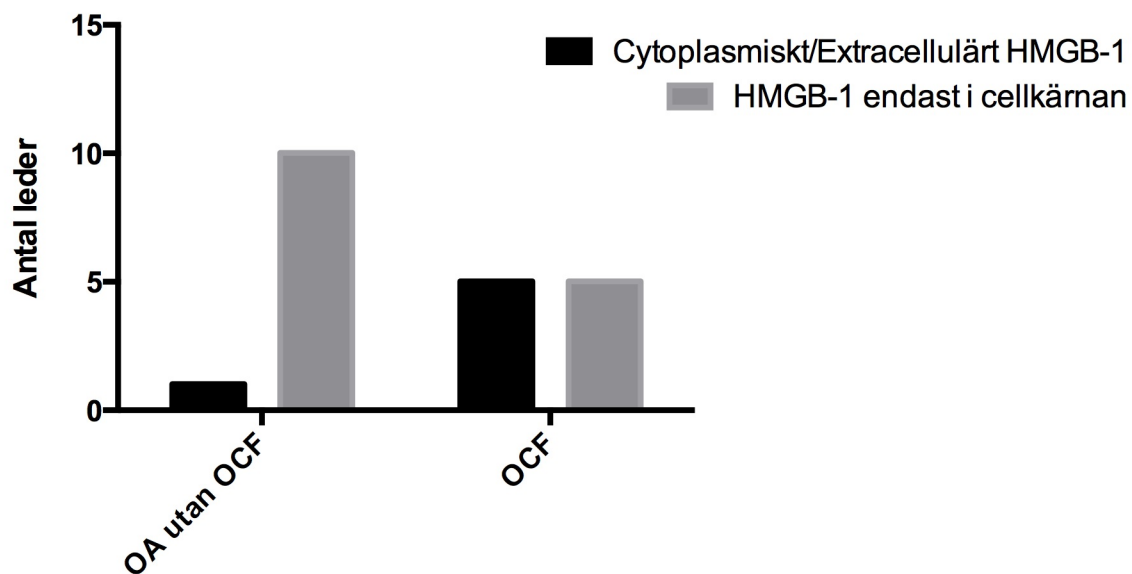


*Figur 6. Medelvärde (med standardavvikelse) av HMGB-1 (ng/mL) som uppmäts i olika leder. Data från Dagis Boström (2013)*

I den tredje studien där man mätt HMGB-1 i ledvätska tittade man på hur koncentrationerna ändrades över tid. Man inducerade ledinflammation genom injektion av 0,5ng lipopolysackorid (LPS) i intercarpalleden hos sex friska hästar. Man tog ledvätskeprover precis innan LPS injektionen, samt 8, 24 respektive 168 timmar efteråt. Vid tiderna 0 och 168 låg HMGB-1 koncentrationen under detekterbara nivåer (<2,5 ng/mL) men efter 8 samt 24 timmar var de signifikant förhöjda. Studiens författare överraskades av den snabba frisättningen av HMGB-1 då man tidigare trott att HMGB-1 frisatts från makrofager senare under inflammationen. Studien använde sig inte av någon kontrollgrupp. (De Grauw *et al.*, 2010).

Ley *et al* (2007) tittade på HMGB-1 i synoviala membran (SM) och osteochondrala fragment (OCF) hos hästar med OA. Studien omfattade 21 hästar som skulle genomgå artroskopi antingen i samband med kirurgi eller för diagnos vid misstanke om ledinflammation samt en kontrollgrupp på 4 hästar som skulle genomgå post mortem undersökning. De undersökta lederna delades in i två grupper, de med OCF och de med OA men utan OCF. Vid mikroskopisk undersökning av SM biopsier från de 25 hästarna fann man hos 19 av hästarna (inklusive samtliga i kontrollgruppen) att HMGB-1 främst förekom i cellkärnorna. I de övriga 6 biopsierna hittade man HMGB-1 i cytoplasman hos flera celler samt extracellulärt, 5 av de

här 6 lederna hade OCF (Ley et al., 2009). De här 5 OCF lederna är däremot bara hälften av alla OCF leder som ingick i studien (figur 7).



Figur 7. Lokalisering av HMGB-1 i OA leder med respektive utan OCF. Data från Ley et al (2007)

I en studie från 2010 undersöktes hur HMGB-1 påverkade uttrycket av gener som påverkar broskmetabolism. Man använde sig av chondrocyter från friska hästar. HMGB-1 behandlade celler visade ett ökat uttryck av Sox9 jämfört med obehandlade kontroller. Sox9 är en transkriptionsfaktor som aktiverar flera gener som är inblandade i bildningen av extracellulärt brosk matrix vilket antyder att HMGB-1 stimulerar proliferationen av chondrocyter samt en ökad metabolism (Ley et al., 2011)

### Framtida behandlingsmetoder?

I en studie från 2003 har *Kokkola et al* tittat på huruvida en hämning av HMGB-1 kan användas som behandlingsmetod vid collagen inducerad artrit hos möss. Artrit inducerades genom injektion av typ II collagen. Därefter behandlades en grupp möss med anti-HMGB-1-antikroppar som riktar mot B-box och en annan med A-box protein. För varje grupp hade man även en kontrollgrupp. Man använde sig av ett artrit-index baserat på hur många olika leder i varje tass som drabbats av OA. Vid ett resultat >2 ansågs mössen ha en tydligt märkbar artrit. Mössen som behandlats med A-box protein hade efter post mortem undersökning ett genomsnittligt artrit-index på 3.2 vilket var signifikant bättre än de i kontrollgruppen som hade ett index på 5.4 (Kokkola et al., 2003).

Mössen som behandlats med anti-HMGB-1 antikroppar hade ett genomsnittligt index på 2.4 vid studiens slut och kontrollgruppen ett resultat på 5.7. Även här hade den behandlade gruppen ett signifikant bättre resultat. Både bland mössen som behandlats med antikroppar och mössen som behandlats med A-box protein ansågs även allmäntillståndet vara bättre än i respektive kontrollgrupp, exempelvis hade de behandlade mössen inte en lika stor viktförlust. Vid mikroskopisk undersökning såg man betydligt mindre brosknedbrytning i de drabbade lederna hos de behandlade mössen (Kokkola et al., 2003).



Det finns även teorier att man skulle kunna hämma HMGB-1 frisättning, och därmed dess proinflammatoriska effekter, genom att undvika den vävnadshypoxi som uppkommer vid artrit och synovit (Hamada *et al.*, 2008). En studie har visat att vävnader hos möss som genomgått *hyperbaric oxygen therapy* (HBOT, en metod där patienter behandlas med 100 % syre vid ökat atmosfäriskt tryck) får en lägre koncentration av extracellulärt HMGB-1 (Liang *et al.*, 2013). Dock finns inga studier specifikt för leder.

### **Andra markörer för osteoartrit**

Det finns flera studier där man försöker hitta lämpliga biomarkörer för ledinflammation hos häst. Därbland prostaglandin E<sub>2</sub>, kväveoxid (NO), TNF- $\alpha$  och IL-1 $\beta$ . Kumulativ stress eller strukturella förändringar i leden, till exempel osteochondros dissecans (OCD) leder till frisättning av TNF- $\alpha$  och IL-1 $\beta$  från synoviocyter och chondrocyter. Dessa cytokiner aktiverar matrix-metalloproteinaser (MMP) och prostaglandin E<sub>2</sub> vilket leder till en nedbrytning av proteoglykaner i bindväv. MMP är viktiga för ombildandet av brosk och bindväv. I en frisk led finns 95% av MMP i en latent form genom att de inhiberas av *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP). Vid OA är MMP koncentrationen högre än TIMP-koncentrationen vilket leder till brosknedbrytning (Trumble *et al.*, 2001).

Koncentrationen av kväveoxid ökar i ledvätska vid OA. Studier har visat att ekvina chondrocyter ökar sin NO syntes efter stimulering med IL-1 $\beta$ . NO kan orsaka apoptos av chondrocyter samt aktivera matrix-metalloproteinaser (van den Boom, 2005). Vad gäller flera av de här markörerna har man kommit betydligt längre i forskningen än vad man har gjort med HMGB-1. Det har till exempel gjorts studier på hur motion och artrocentes (instick i leden) påverkar uttrycket av TNF- $\alpha$ , prostaglandin E<sub>2</sub> och kväveoxid. Man är överens om att dessa markörers koncentration i ledvätska ökar vid OA men för att kunna användas i diagnostiken ville *van den Boom et al* titta närmre på hur de påverkas av olika miljöfaktorer. Inte minst påverkan till följd av artrocentes är viktigt att ta i beaktande vid diagnostik då man måste göra ett instick i leden för att få ett ledvätskeprov. Man fann att upprepad artrocentes med ett intervall på 12 timmar gav upphov till ökade NO koncentrationer i kotleder jämfört med kontrollgrupper. Även en statistiskt säkerställd ökning av prostaglandin E<sub>2</sub> uppmättes vid samma intervall i radiocarpalleder. Ett intervall >12 timmar resulterade inte i någon ökning för någon av markörerna (van den Boom, 2005).

För att undersöka motionens inverkan på markörerna jämfördes hästar som fick röra sig i samtliga gångarter på löpband och i skrittmaskin totalt 70-80 minuter dagligen (durationen ökades succesivt) med hästar som endast skrittades för hand 5 min per dag. Koncentrationerna av prostaglandin E<sub>2</sub> och TNF- $\alpha$  var högre i ledvätskan i samtliga undersökta leder i motionsgruppen jämfört med kontrollgruppen (van den Boom, 2005). En fördel med HMGB-1 som markör jämfört med framförallt prostaglandin E<sub>2</sub> och NO är att det krävs mindre mängd ledvätska för analys (Brown *et al.*, 2009). En HMGB-1 ELISA kan utföras med 10  $\mu$ l ledvätska medan analysmetoderna som använts för prostaglandin E<sub>2</sub> och NO i de studier som det här arbetet studerat har krävt 700 respektive 100  $\mu$ l ledvätska. Prostaglandin E<sub>2</sub>-analys har utförts med hjälp av masspektrometri och NO har analyserats genom att mäta hur mycket

nitrit som bildas i ett så kallat Griess-test. I ett Griess-test använder man sig kortfattat av spektrofotometri för att mäta absorbans efter tillsats av bland annat sulphanilamid (van den Boom, 2005).

## DISKUSSION

Sammanfattningsvis behövs det fler hästspecifika studier om HMGB-1 för att kunna svara på huruvida det kan användas vid diagnostik och behandling av ledinflammation. De fem studier som finns visar att HMGB-1 förekommer i hästarnas leder och visar på en ökning av koncentration i samband med inflammation men det är egentligen endast studien av *Brown et al* (2009) som innehåller tillräckligt många hästar samt tydlig kontrollgrupp att man kan dra några säkra slutsatser. Det behövs fler större studier där man använder hästar med så lika förutsättningar och sjukdomsförlopp som möjligt till exempel genom att bygga upp en biobank med material från OA hästar som samlas in under flera år innan studien utförs. Man behöver även titta mer på skillnader mellan olika leder. Var det till exempel bara ett sammanträffande att man i *Dagis Boströms* studie (2013) inte uppmätte någon HMGB-1 koncentration i ledvätska från hasleder eller stämmer det att förekomsten och frisättningen är lägre där jämfört med andra leder?

Man skulle även behöva göra studier liknande *Van den Boom et al*s (2005) där man tittar på hur HMGB-1 koncentrationerna påverkas av faktorer som motion och artrocentres för att öka precisionen i användandet av HMGB-1 som ett diagnostiskt instrument. Det är framförallt viktigt att veta om artrocentres påverkar HMGB-1 koncentration eftersom man är tvungen att göra ett instick i leden för få ett ledvätskeprov för analys. Man bör överlag iakttä stor försiktighet vid instick i leden då det finns en risk för infektion och septisk artrit. Artrocentres kräver att man utför en noggrann desinfektion av huden samt ser till att nålen och handskar inte kontamineras. Det är däremot omöjligt att få huden helt steril så det föreligger alltid en risk att mikroorganismer från hudens yta kommer in i leden vid artrocentres (*Wahl et al.*, 2012). Man bör alltid ta det i beaktande när man gör ett instick i leden även om risken för septisk artrit är väldigt liten. I en studie där man tittade på 16 624 ledinjektioner av corticosteroider eller antibiotika i olika leder hos fullblodshästar resulterade endast 13 injektioner i septisk artrit (*Steel et al.*, 2013).

En annan fundering är att de immunanalyser (ELISA) som använts vid häststudierna är anpassade för humant HMGB-1. Proteinet är till 99 % identiskt mellan alla däggdjur (*Müller et al.*, 2004) så det bör inte vara någon skillnad i resultaten men för att kunna använda som ett tillförlitligt instrument i hästdiagnostiken vore det kanske lämpligt med en hästspecifik analysmetod.

När och om man hittar ett precist sätt att använda HMGB-1 i diagnostiken av OA hos häst kan man börja titta på om det går att använda vid behandling, antingen via en inhibering eller med hjälp av A-box anti-inflammatoriska egenskaper men detta ligger troligtvis långt in i framtiden.

## REFERENSER

- Andersson, U. & Erlandsson-Harris, H. (2004). HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *Journal of Internal Medicine*, vol. 255(3), ss. 344-50.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H. & Tracey, K.J. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192(4), ss. 565-70.
- Brown, M.P., Trumble, T.N. & Merritt, K.A. (2009). High-mobility group box chromosomal protein 1 as a potential inflammatory biomarker of joint injury in Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 70(10), ss. 1230-5.
- Dagis Boström, M. (2013). *Interleukin-1 $\beta$  och HMGB-1 hos halta hästar*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- de Grauw, J.C. (2011). Molecular monitoring of equine joint homeostasis. *Veterinary Quarterly*, vol. 31(2), ss. 77-86.
- De Grauw, J.C., Heinola, T., Van Weeren, R., Kiviranta, I. & Konttinen, Y.T. (2010). Rapid release of high mobility group box protein-1 (HMGB-1) in transient arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 28(2), ss. 292-293.
- Hamada, T., Torikai, M., Kuwazuru, A., Tanaka, M., Horai, N., Fukuda, T., Yamada, S., Nagayama, S., Hashiguchi, K., Sunahara, N., Fukuzaki, K., Nagata, R., Komiya, S., Maruyama, I. & Abeyama, K. (2008). Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, vol. 58(9), ss. 2675-85.
- Kokkola, R., Andersson, A., Mullins, G., Ostberg, T., Treutiger, C.J., Arnold, B., Nawroth, P., Andersson, U., Harris, R.A. & Harris, H.E. (2005). RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 61(1), ss. 1-9.
- Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U. & Harris, H.E. (2003). Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis and Rheumatology*, vol. 48(7), ss. 2052-8.
- Kokkola, R., Sundberg, E., Ulfgren, A.K., Palmblad, K., Li, J., Wang, H., Ulloa, L., Yang, H., Yan, X.J., Furie, R., Chiorazzi, N., Tracey, K.J., Andersson, U. & Harris, H.E. (2002). High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis and Rheumatology*, vol. 46(10), ss. 2598-603.
- Ley, C., Ekman, S., Elmen, A., Nilsson, G. & Eloranta, M.L. (2007). Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. *Journal of Veterinary Medicine. A Physiology, Pathology, Clinical Medicine* vol. 54(7), ss. 346-51.
- Ley, C., Ekman, S., Roneus, B. & Eloranta, M.L. (2009). Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. *Research in Veterinary Science*, vol. 86(3), ss. 490-497.
- Ley, C., Svala, E., Nilton, A., Lindahl, A., Eloranta, M.L., Ekman, S. & Skioldebrand, E. (2011). Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. *Connective Tissue Research* vol. 52(4), ss. 290-300.
- Liang, F., Kang, N., Liu, X., Yang, J., Li, Z. & Tan, J.W. (2013). Effect of HMGB1/NF-kappaB in hyperbaric oxygen treatment on decreasing injury caused by skin flap grafts in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol.17(15), ss. 2010-8.

- Loeser, R.F., Yammani, R.R., Carlson, C.S., Chen, H., Cole, A., Im, H.J., Bursch, L.S. & Yan, S.D. (2005). Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, vol. 52(8), ss. 2376-85.
- Mueller-Planitz, F., Klinker, H. & Becker, P.B. (2013). Nucleosome sliding mechanisms: new twists in a looped history. *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 20(9), ss. 1026-32.
- Müller, S., Ronfani, L. & Bianchi, M.E. (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *Journal of Internal Medicine*, vol. 255(3), ss. 332-343.
- Pullerits, R., Jonsson, I.M., Verdrengh, M., Bokarewa, M., Andersson, U., Erlandsson-Harris, H. & Tarkowski, A. (2003). High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, vol. 48(6), ss. 1693-700.
- Steel, C.M., Pannirselvam, R.R. & Anderson, G.A. (2013). Risk of septic arthritis after intra-articular medication: a study of 16,624 injections in Thoroughbred racehorses. *Australian Veterinary Journal*, vol. 91(7), ss. 268-73.
- Trumble, T.N., Trotter, G.W., Oxford, J.R., McIlwraith, C.W., Cammarata, S., Goodnight, J.L., Billingham, R.C. & Frisbie, D.D. (2001). Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 62(9), ss. 1467-77.
- Ugrinova, I., Pashev, I.G. & Pasheva, E.A. (2009). Nucleosome binding properties and Co-remodeling activities of native and in vivo acetylated HMGB-1 and HMGB-2 proteins. *Biochemistry*, vol. 48(27), ss. 6502-7.
- van den Boom, R., van den Lest, C.H.A., Bull S., Brama, P.A.J., van Weeren, P.R. (2005). Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine Veterinary Journal*, vol. 37(3), ss. 250--256.
- Wahl, K., Adams, S.B. & Moore, G.E. (2012). Contamination of joints with tissue debris and hair after arthrocentesis: the effect of needle insertion angle, spinal needle gauge, and insertion of spinal needles with and without a stylet. *Veterinary Surgery* vol. 41(3), ss. 391-8.
- Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C.J., Roth, J., Warren, H.S., Fink, M.P., Fenton, M.J., Andersson, U. & Tracey, K.J. (2004). Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101(1), ss. 296-301.
- Yang, H., Wang, H., Czura, C.J. & Tracey, K.J. (2005). The cytokine activity of HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 78(1), ss. 1-8.